



SEMMELWEIS EGYETEM

ORVOSI VEGYTANI, MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI ÉS PATHOBIOKÉMIAI INTÉZET

<http://semmelweis.hu/orvosi-vegytan/>
Igazgató : Dr. Bánhegyi Gábor egyetemi tanár
1094 Budapest, IX. Tüzoltó u. 37-47.
Tel/Fax : 266 26 15; Tel : 459 1500 / 60100
E-mail: banhegyi.gabor@med.semmelweis-univ.hu
Postacím : 1444 Budapest Pf. 260

Válasz Dr. Vellai Tibor bírálataira

Köszönöm Dr. Vellai Tibornak, hogy értekezésemet és gondosan átolvasta, az abban foglaltakat építő kritikai észrevételeivel és inspiráló kérdéseivel ellátta. Válaszaimat az alábbiakban adom meg:

1. Angol szakmai terminusok használata. Magam is támogatom a magyar terminusok használatát, ezáltal tudományos nyelvünk és kultúránk gondozását, ezért külön köszönöm a gondolatébresztő észrevételt. Valóban, az inzulin szignál, és általában a szignál helyett helyénvalóbb az inzulin jelátvitel, illetve jelátvitel, jel kifejezések használata. A címben is szereplő „stressz-reszponzív” ’anglomán’ kifejezés, és talán érthetőbb és egyszerűbb lett volna a Bíráló által javasolt stressz-válaszok használata. A reszponzív szóval leginkább az élő szervezetre jellemző, az érzékelés képességéből fakadó *válaszképes*, *fogékony*, tulajdonságokat szerettem volna hangsúlyozni, hiszen ezek a mechanizmusok nemcsak a változásra adott választ, hanem annak *érzékelését* és magukban rejtik. Emellett néhány eredmény (pl. az inert denaturált fehérjék és sejtproliferáció, valamint az oxidatív stressz és a hősokkválasz kapcsolata) két stressz illetve valamilyen kiváltott válasz közötti kapcsolatot ír le, mely nem sorolható a hagyományos stressz-válasz kategóriába. A fentemlített minőséget számomra megnyugtatóan a stressz-érzékelő szó fejezi ki, így a jövőben ezt fogom használni.

2. A szirtuinok és az élettartam. Köszönöm a kérdést, mely nemcsak egy ’ezoterikus’ alapkutatási kérdésre, hanem egy olyan jelenségre irányul, melyre egy milliárdos gyógyszeripari paradigmát építettek fel. Emellett rengetegen fogyasztanak resveratrol tartalmú táplálékkiegészítőket állatkísérletek eredményei (illetve azok sajtóban megjelent hírverése) alapján, azonban megalapozott hosszútávú randomizált humán vizsgálatok hiányában.

A kérdésre adott válaszom egyszerű verziója: A szirtuinok élettartamra és öregedési folyamatra kifejtett hatását az eddigi eredmények alapján elképzelhetőnek tartom. Ennek megerősítésére illetve a mechanizmusok feltárására további kutatások szükségesek.

A válasz komplex verziója: Eredményeink szerint a SIRT1 emlős szirtuin *sir-2.1* (illetve *dSir2*) ortológjainak túltermelésével létrehozott *Caenorhabditis elegans* (és *Drosophila melanogaster*) törzsek élettartamának növekedését nem a szirtuinok megnövekedett mennyisége, hanem egyéb, nemspecifikus tényezők okozták. Ez nem zárja ki, hogy a szirtuinoknak lenne hatása az élettartamra, csak megkérdőjelezi a robusztus, gerinctelenekben kimutatott hatást, és újabb, gondosabban tervezett kísérletekre hív. A válasz árnyalt, ezért két részre bontom.

a) A *Sir2* szerepe a gerinctelenek élettartamában: Valóban, tanulmányunk nyomán több laboratórium jött ki olyan eredményekkel, melyek a képet árnyalják (*C. elegans*: Viswanathan and Guarente Nature 2011, Ludewig és *mtsai* PNAS 2013, Mouchiroud és *mtsai* Cell 2013; Schmeisser és *mtsai* Nat Chem Biol 2013; *Drosophila*: Whitaker és *mtsai* Aging 2013, Jiang és *mtsai* Aging 2013). A *C. elegans* tanulmányok vagy nem találnak élettartam növekedést az alacsony kópiaszámú *sir-2.1* túltermelő törzseknél (Ludewig és *mtsai* PNAS 2013), vagy kismértékű élettartamnövekedésről számolnak be a magas kópiaszámú *sir-2.1* túltermelő törzseknél, és a mechanizmust a NAD^+ -szint által befolyásolt mitohormézisben azonosítják. A *Drosophila* közlemények a *dSir2* túltermelés dóziszfüggő élettartamnövelő hatásáról (a 2-5x-ös túltermelés optimális; nagyobb dózis káros az élettartamra) és a génexpresszió csendesítésének öregedéssel kapcsolódó eltűnésére gyakorolt védelemről számolnak be. Korábbi és újabb eredmények szerint nem a *sir-2.1*, hanem neuronális jelek és mitohormézis vehetnek részt a *C. elegans* táplálék csökkentése által létrehozott élettartam növekedésben (pl. Schmeisser és *mtsai* Mol Metab 2013). Ugyannakkor a magas populáció denzitást (ezáltal túlnépesedési stresszt) jelző aszkarozid molekulák a kemoszensoros ASK neuronokon és a *sir-2.1*-en keresztül növelik meg az élettartamot (Ludewig és *mtsai* PNAS 2013).

b) A szirtuinok szerepe az emlősök élettartamában: Az emlős szirtuin deacetiláz enzimsaládnak hét tagja van: SIRT1-7. Legismertebb tag a SIRT1. A teljes SIRT1 és SIRT6 génkiütött egerek az embrionális vagy a korai posztnatális időszakban elpusztulnak (Cheng és *mtsai* PNAS 2003, Mostoslavsky és *mtsai* Cell 2006), a nem beltenyésztett SIRT KO egér steril, (koponya)fejlődési rendellenességeket mutat, ezért az élettartamát nem lehet interpretálni (Boily és *mtsai* PLoS One 2008). A SIRT6 túltermelő hím egerek 15%-kal tovább élnek (Kanfi és *mtsai* Nature 2012), melynek mechanizmusa talán az IGF-1 szint csökkenése, és ivar-specifikus hatásának háttere ismeretlen. A SIRT1-et az összes szövetben (mintegy 2-3-szorosan) túltermelő egerek élettartama nem változik, azonban egészségük jobb, és védelmet élveznek a magas zsírtartalmú étrend-okozta metabolikus szindróma és a szövődmenyes tumorok ellen (Pfluger és *mtsai* PNAS 2008, Banks és *mtsai* Cell Metab 2008, Herranz és *mtsai* Nat Commun 2010). A SIRT1 neuronális (pontosabban hipotalamikus) túltermelése megnöveli az egerek élettartamát (Satoh és *mtsai* Cell Metab 2013). Más szirtuinok túltermelése által okozott élettartam növekedésről nincs adat. A tápanyag csökkentés által okozott viselkedési, metabolikus és endokrin válaszban számos vizsgálat erősíti meg a (neuronális) SIRT1 (és a SIRT3) fontos, ha nem központi szerepét (Boily és *mtsai* PLoS One 2008, Cohen és *mtsai* Genes Dev 2009; Someya és *mtsai* Cell 2010), bár egy eredmény épp a neuronális SIRT1 hiányos egerek fokozott inzulin érzékenységről számol be (Lu és *mtsai* J Biol Chem 2013). A tápanyag csökkentés-indukálta élettartamnövekedés nem jön létre SIRT1 KO egerekben, viszont elegendő az egyik SIRT1 allél jelenléte (Mercken és *mtsai* Aging Cell 2014). A SIRT1 túltermelés egerekben nem segíti elő a tápanyag csökkentés általi antitumor hatást (Herranz és *mtsai* Cell Cycle 2011), hanem bizonyos körülmények között, pl. PTEN deficiencia esetén tumor promóter hatású (Herranz és *mtsai* Oncogene 2013).

Összefoglalva, a szirtuinok élettartam meghatározásban történő részvétele jóval komplexebb, mint a mitikus „egy gén – robusztus hatás” paradigma. Gerinctelenekben és emlősökben a szirtuinok élettartamnövelő vagy -csökkentő hatása egyaránt számos tényezőtől (gén dózis, szövet, közeg és tápláltsági állapot, neuronális impulzusok) függhet. Véleményem szerint az optimális egészséges élettartamot a szirtuinok és egyéb tápanyag érzékelő molekulák-útvonalak finomra hangolt kölcsönhatása alakíthatja ki, ahol vannak erőteljesebben ható, domináns tényezők (ezek egyike épp a Bíráló által leírt TOR *C. elegans* élettartamra kifejtett hatása, Vellai és *mtsai* Nature 2003). A tápanyag csökkentés esetén a szirtuinok jelenléte szükséges, de hogy elégséges-e, és terápiás megcélzásuk előidézi-e a

vágyott hatásokat, és mentes lesz-e bizonyos mellékhatásoktól (pl. tumorok), azt további szisztematikus vizsgálatok dönthetik el.

3. Az oxidatív stressz hősokkválaszra kifejtett gátló hatásában részt vevő miRNS-ek és mRNS-ek azonosítása. Köszönöm a kérdést, mely egy minket is komolyan foglalkoztató témára, a hősokkválasz miRNS-függő regulációjára irányul. Kísérleteinkben a hősokkválasz egyik kulcsszereplőjének, a Hsp70-nek posztranszkripció gátlását figyeltük meg. A közlemény készültével párhuzamosan Kalmár Lajossal (Enzimológiai Intézet) együttműködésben bioinformatikai módszerekkel 6 miRNS gént prediktáltunk, melyek potenciálisan a Hsp70 3'UTR régiójához köthetnek. A cikk első szerzője, Spiró Zoltán külföldi PhD ösztöndíja és emberi erőforrás hiánya miatt a projektet nem folytattuk. A prediktált miRNS-ek közül kettőt, mint a Hsp70 expressziót gátló miRNS-t egy közleményben kísérletesen azonosítottak (Namba és mtsai PLoS One 2011).

Terveink között szerepelt az ezen miRNS-ek szintjének mérése kontroll és H₂O₂-kezelt sejtekből; a megfelelő miRNS-ekkel, illetve antiszenz miRNS-ekkel történő transzfekció után a Hsp70 expresszió követése; a megfelelő *C. elegans* ortológ miRNS-ek azonosítása és a Hsp-70 expresszió illetve a termotolerancia vizsgálata a miRNS mutánsokkal. Rendszerszintű vizsgálatok a H₂O₂ által indukált miRNS expressziós profil mély szekvenálással történő meghatározása és a változást mutató miRNS-ek Hsp70 expresszióra/3'UTR aktivitásra kifejtett hatásának mérése. A cél mRNS-ek meghatározása kísérletes módszerekkel nem könnyű, hiszen elképzelhető (ahogy a Hsp70 példáján láttuk), hogy a miRNS a cél mRNS szintet nem csökkenti, azonban a riboszómához kötést és a transzlációt meggátolja. Ennek elkerülésére izolálhatjuk a kontroll illetve a H₂O₂-előkezelt hősokkolt sejtekből a teljes mRNS-t illetve az aktívan transzlálódó mRNS-eket a poliriboszómák elválasztásával, majd az izolált és reverz transzkripcióval kapott cDNS-ekből az mRNS szekvenciáit microarray-vel vagy mély szekvenálással azonosíthatjuk.

4. Az autofágia potenciális szerepe az SKN-1 immunitást serkentő hatásában. Köszönöm az izgalmas kérdést. A Bíráló által említett intracelluláris kórokozók (C. elegans-on: Jia és mtsai PNAS 2009) túlmenően új eredmények bizonyítják, hogy az autofágia emlősökben kritikus szerepet játszik az általunk is vizsgált extracelluláris *Pseudomonas aeruginosa* elleni védelemben (Yuan és mtsai J Cell Sci 2012), valamint az intesztinális patogén szöveti disszeminációjának megakadályozásában (Benjamin és mtsai Cell Host Microbe 2013). Az Nrf2-ről igazolták, hogy a LPS hatására Toll-like receptor TLR4 - p38MAPK úton aktiválódik és aktiválja a p62 expresszióját és az autofágiát. Az SKN-1-ről korábban kimutatták, hogy jónéhány lizoszómális, autofágiában résztvevő gén expresszióját serkenti (Oliveira és mtsai Aging Cell 2009). Mindezek alapján az autofágia szerepét az SKN-1 immuntámogató hatásában nemhogy elképzelhetőnek, hanem erősen valószínűnek tartom, és erre utaló eredmény nincs még az irodalomban. Igazolására egyszerű kísérlettel a patogén hatására egy autofág (LC-3) riportert vizsgálnék vad és *skn-1* deficiens háttéren, mellyel az autofágia *skn-1*-függő aktivációját tudnám kideríteni. Azt, hogy az autofágia közvetíti-e az *skn-1* hatását, SKN-1 funkciónyerő és funkcióvesztő mutánsok valamint autofág (*bec-1*) mutáns kombinációjának patogén rezisztencia vizsgálatával dönteném el.

5. Humán hősokkfehérjék képesek-e menekíteni a Hsp90-deficiens élesztő törzsek fenotípusát. A Hsp90 élesztőben és emberben egyaránt esszenciális fehérje. Szerepe specifikusan számos kvázi-feltekeredett metastabil fehérje stabilizálása. Ennek következtében más humán Hsp fehérjék akár túltermelve (ami egy aspecifikus chaperon hatás hiányát kompenzálná) sem képesek menekíteni a Hsp90-génkiütött élesztő életképtelenségét.

Újfent köszönöm Dr. Vellai Tibornak az elismerő bírálatot, az elgondolkodtató kérdéseket, valamint hogy munkámat az MTA doktora címre érdemesnek tartja.

Tisztelettel,



Sóti Csaba, M.D., Ph.D.

Budapest, 2014. április 29.